



Customer Number 22,852
Attorney Docket No. 03806.0448

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Inventors: Joel CROUZET et al.) Examiner: James S. Ketter
Application No.: 09/369,883)
Filed: August 9, 1999) Group Art Unit: 1636
Allowed: June 4, 2004) Confirmation No: 7384
For: FORMULATION OF STABILIZED)
CATIONIC TRANSFECTION)
AGENT(S)/NUCLEIC ACID)
PARTICLES)

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

CLAIM FOR PRIORITY

Under the provisions of Section 119 of 35 U.S.C., applicants hereby claim the benefit of the filing date of French Application No. N°97/01467, filed February 10, 1997, for the above identified United States Patent Application.

In support of applicants' claim for priority, filed herewith is one certified copy of the above.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

Dated: September 3, 2004

By:


Ernest F. Chapman
Reg. No. 25,961



THIS PAGE BLANK (USPTO)



REPUBLIQUE FRANCAISE



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

24 JUIN 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

M. Planche

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

10 FEV 1997

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 01467 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

10 FEV. 1997

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire



certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen

brevet d'invention certificat d'utilité n°

n° du pouvoir permanent références du correspondant
1 Janvier 94 ST97001 01 55 71 70 36

date

Établissement du rapport de recherche

différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui

non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

FORMULATION DE PARTICULES AGENT(S) DE TRANSFECTION CATIONIQUE(S)/ ACIDES NUCLEIQUES STABILISEES

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3 0 4 4 6 3 2 8 4 code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

RHONE-POULENC RORER S.A.

Nationalité (s)

FRANÇAISE

Adresse (s) complète (s)

Pays

20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DÉMARCHANT (S.A.)
(nom et qualité du signataire, n° d'inscription)
Rhone-Poulenc Rorer S.A.

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

LE COUPANEC Pascale

**BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT
D'UTILITE**

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9701467

ST97001

TITRE DE L'INVENTION :

+

FORMULATION DE PARTICULES AGENT(S) DE TRANSFECTION CATIONIQUE(S)/
ACIDES NUCLEIQUES STABILISEES

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

RHONE-POULENC RORER S.A.
20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

CROUZET Joël

12 rue Michel Voisin - 92330 SCEAUX (FRANCE)

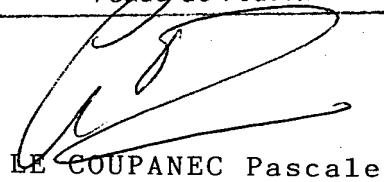
PITARD Bruno

3 rue Gaston Levy - 92330 SCEAUX (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire
Antony, le 7 février 1997

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir


LE COUPANEC Pascale

ORIGINAL

La présente invention se rapporte à des associations agent(s) de transfection cationique(s)/ADN dont les particules sont stabilisées en taille à l'aide d'un agent de surface non ionique et à leurs utilisations en thérapie génique.

5 De nombreuses maladies génétiques sont associées à un défaut d'expression et/ou une expression anormale, c'est à dire déficiente ou excessive, d'un ou plusieurs acides nucléiques. La thérapie génique a pour principal objectif de corriger ce type d'anomalies génétiques par le biais de l'expression cellulaire *in vivo* ou *in vitro* de gènes clonés.

10 Aujourd'hui, plusieurs méthodes sont proposées pour la délivrance intracellulaire de ce type d'information génétique. L'une d'entre elles, en particulier, repose sur l'emploi de vecteurs chimiques ou biochimiques. Les vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, complexer l'ADN à transfacter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas 15 échéant, à travers les deux membranes nucléaires. Parmi les vecteurs synthétiques développés, les polymères cationiques de type polylysine et DEAE dextran ou encore les lipofectants sont les plus avantageux.

Un progrès important a été accompli dans ce mode de transfection avec le développement d'une technologie basée sur l'emploi d'agents de transfection 20 cationiques de type lipofectants et plus précisément de lipides cationiques. Il a ainsi été mis en évidence qu'un lipide cationique chargé positivement, le chlorure de N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA), interférait, sous la forme de liposomes ou de petites vésicules, spontanément avec de l'ADN, qui est chargé

négativement, pour former des complexes lipides-ADN, capables de fusionner avec les membranes cellulaires, et permettait ainsi la délivrance intracellulaire de l'ADN.

Depuis le DOTMA, d'autres lipides cationiques ont été développés sur ce modèle de structure : groupe lipophile associé à un groupement amino via un bras dit "spacer". Parmi ceux-ci, on peut plus particulièrement citer ceux comprenant à titre de groupement lipophile deux acides gras ou un dérivé du cholestérol, et comportant, en outre, le cas échéant, à titre de groupement amino, un groupement d'ammonium quaternaire. Les DOTAP, DOBT ou le ChOTB peuvent notamment être cités à titre représentatifs de cette catégorie de lipides cationiques. D'autres composés, comme les DOSC et ChOSC, se caractérisent par la présence d'un groupement choline à la place du groupement d'ammonium quaternaire.

Une autre catégorie de lipofectants, les lipopolyamines, a également été décrite. De manière générale, il s'agit d'une molécule amphiphile comprenant au moins une région hydrophile polyamine associée par une région dite spacer à une région lipophile. La région polyamine des lipopolyamines, chargée cationiquement, est capable de s'associer de manière réversible avec l'acide nucléique, chargé négativement. Cette interaction compacte fortement l'acide nucléique. La région lipophile rend cette interaction ionique insensible au milieu externe, en recouvrant la particule nucléolipidique formée d'une pellicule lipidique. Dans ce type de composés, le groupement cationique peut être représenté par le radical L-5carboxyspermine qui contient quatre groupements d'ammonium, deux primaires et deux secondaires. Les DOGS et DPPES en font notamment partie. Ces lipopolyamines sont tout particulièrement efficaces pour la transfection de cellules endocrines primaires. A titre représentatif de cette dernière famille de composés on peut plus particulièrement faire

état des lipopolyamines décrites notamment dans les demandes de brevet WO96/17823 et PCT/FR96/017774.

Toutefois, l'efficacité de ces vecteurs synthétiques reste à améliorer notamment en terme de complexation avec l'acide nucléique et plus précisément sur le plan de la 5 stabilité des particules de ces complexes nucléolipidiques. En effet, avec les formulations classiques acides nucléiques/agent de transfection cationique on assiste fréquemment et rapidement à un phénomène d'aggrégation des particules de complexes. De tels agrégats possèdent évidemment une taille difficilement compatible avec une transfection thérapeutique. Une des solutions proposées jusqu'ici pour 10 prévenir ce type de phénomène de précipitation, consiste à introduire dans la formulation, l'agent de transfection cationique, comme par exemple le lipofectant, en quantité excessive c'est à dire dans un rapport de charge lipofectant/acides nucléiques de l'ordre de 10 voire plus. Outre le fait qu'une telle solution n'est pas toujours efficace, elle n'est pas totalement satisfaisante sur le plan de l'innocuité. Les agent de 15 transfection cationiques comme les lipofectants et polymères cationiques sont en soit des composés qui, en quantités importantes, risquent de présenter une toxicité relative pour les cellules les incorporant.

Il serait donc particulièrement intéressant de disposer sur le plan thérapeutique de formulations agents de transfection cationiques/acides nucléiques possédant des 20 rapports de charges réduits et néammoins stabilisées dans le temps sous la forme de particules non aggrégées. Or, comme il l'est énoncé précédemment, les zones de concentrations acides nucléiques/lipofectants répondant à de tels rapports de charges sont généralement associées à un état physique instable. On assiste rapidement à un phénomène d'aggrégation des particules nucléolipidiques. Qui plus est, on sait 25 également que la présence d'un sel de type NaCl, classiquement mis en oeuvre dans les

formulations agents de transfection cationiques/acides nucléiques, peut induire à certaines concentrations, la précipitation des particules nucléolipidiques. Ainsi, la gamme de concentration en agent de transfection pour laquelle on observe la précipitation sera d'autant plus grande que la concentration en sel sera élevée.

5 La présente invention a précisément pour objectif de valoriser ces zones de concentrations agent de transfection cationique/acides nucléiques, intéressantes sur le plan de l'innocuité pour leurs quantités réduites en vecteur et également sur le plan interférence avec d'autres protéines compte tenu de leur charge réduite. En effet, lorsque les complexes sont relativement peu chargés, le risque qu'ils interfèrent avec
10 les protéines du sérum *in vivo* est significativement réduit. Ceci est bien entendu particulièrement avantageux pour le transfert d'acides nucléiques *in vivo* (Remy,J.S. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92, 1744-1748). De nombreux articles font état de ce type d'interactions entre les protéines du sérum et des liposomes (Senior,J.H. et al. Biochim Biophys Acta 1991, 1070, 173-179; Hernandez-Caselles, T et al. 15 MoMolecular and cellular Biochemistry 1993, 120 119-126; Oku, N. et al. Biochim Biophys Acta 1996, 1280 149-154). Des données ont également été publiées sur l'activation du système du complément par des complexes à base d'ADN utilisés pour la thérapie génique. Le degré d'activation du complément dépend du rapport cation/ADN (ou rapport de charge). Ce dernier phénomène est surtout vrai pour les
20 polycations comme les polylysines, les lipospermines (par ex DOGS). L'activation du complément est moins sensible au rapport de charge pour les ammoniums quaternaires comme le DOTAP, le DC Chol le DOTMA (Plank, C. et al. Human Gene Therapy 1996, 7, 1437-1446).

En conséquence, il serait particulièrement intéressant de disposer sur le plan
25 thérapeutique de formulations en complexes agents de transfection cationiques/acides

nucléiques à concentration élevée en acides nucléiques et/ou à des rapport de charge réduits voire proches de la neutralité et qui soient en outre stabilisées sous une forme fluide de type colloïdale c'est à dire non agrégées, deux spécificités naturellement inconciliables semble t-il.

5 De manière inattendue, la demanderesse a mis en évidence que l'adjonction d'un agent de surface non ionique à des particules de complexes agent(s) de transfection cationique(s)/acides nucléiques, naturellement instables c'est à dire susceptibles, d'évoluer rapidement vers la formation d'aggrégats, permettait de s'opposer efficacement à ce phénomène et donc de stabiliser les particules de complexes à une
10 taille de particule inférieure à ou de l'ordre de 160nm.

La présente invention a pour premier objet une composition utile en thérapie génique comprenant des particules de complexes agent(s) de transfection cationique(s)/acides nucléiques caractérisée en qu'elle incorpore en outre au moins un agent de surface non ionique en quantité suffisante pour stabiliser la tailles desdites
15 particules à une dimension inférieure ou égale à 160nm.

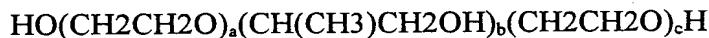
Au sens de l'invention, on entend désigner par des particules stabilisées, des particules dont la taille n'est pas susceptible d'évoluer au cours du temps, lorsque notamment ces particules sont maintenues en dispersion dans une solution. Contrairement aux formulations classiques, c'est à dire exempt d'agent de surface non
20 ionique, les compositions revendiquées peuvent être conservées de manière plus prolongée dans le temps sans que puisse être notée une quelconque modification, de type aggrégation notamment, au niveau de cette dispersion. La taille des particules ainsi stabilisées évoluent généralement entre 50 et 160nm, de préférence entre 75 et 150nm.

En absence de l'agent de surface non ionique revendiqué, les particules de complexes présentes dans la composition revendiquée, conduisent spontanément à des agrégats particulaires de taille supérieure à 160 nm.

Les agents de surface non ioniques, conformes à la présente invention, possèdent de préférence au moins un segment hydrophobe et au moins un segment hydrophile. La partie hydrophobe peut être aussi bien une chaîne aliphatique, un polyoxyalkylène, un polyester d'alkyldène, le cholestérol. Quant à la partie hydrophile, il peut s'agir d'un polyoxyalkylène, d'un mono- ou di-saccharide.

De manière préférée, l'agent de surface mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention est ou dérive d'un polyol non ionique et plus particulièrement d'un polyoxyalkylène avec des groupements alkylène de longueurs et/ou de conformations différentes ou non, au sein du polymère.

Plus préférentiellement, il répond à la formule générale suivante:



avec a, b et c représentant indépendamment l'un de l'autre des nombres entiers pouvant varier entre 20 et 100.

L'agent non ionique est de préférence présent dans les compositions selon l'invention à une concentration comprise entre 1% à 10% poids/volume de ladite composition et plus préférentiellement entre 1 et 5% poids/volume.

La présence d'un tel agent de surface non ionique en association avec les complexes est avantageuse à plusieurs titres:

Selon l'invention, les agent(s) de transfection cationique(s) et acides nucléiques sont présents dans la composition dans un rapport de charge qui naturellement est propice au développement d'un phénomène d'aggrégation. Ceci sous entend que les charges positives portées par le ou les agent(s) de transfection cationique(s) ne sont qu'en léger excès comparativement aux charges négatives portées par l'acide nucléique complexé, voire au mieux les compensent totalement. Un tel rapport de charge est particulièrement avantageux sur le plan *in vivo* car moins préjudiciable en terme d'interaction avec le sérum ou autres protéines comme par exemple l'albumine et plus intéressant sur le plan innocuité. A titre illustratif, ce rapport de charge évolue de 5 préférence entre 1 et 6 et plus préférentiellement est inférieur à 4.

10 Enfin, cet agent de surface est tout à fait compatible avec une administration *in vivo*. Dans le cas des formulations conformes à l'invention il n'est en effet pas nécessaire de procéder à une élimination de cet agent de surface non-ionique, préalablement à leur injection dans les cellules à traitées.

15 Enfin les compositions selon l'invention peuvent être avantageusement stockées. La présence de l'agent de surface non ionique s'oppose efficacement à tout phénomène de précipitation au sein de ladite composition.

A titre d'agent de surface préféré selon l'invention on citera tout particulièrement le composé de formule générale
20 $\text{OH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^a(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH})^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^c\text{H}$. avec a égal à 75, b à 30 et c à 75.

Par agent de transfection cationique on désigne de préférence selon l'invention les polymères cationiques et les lipofectants.

En ce qui concerne plus particulièrement les lipofectants, on entend couvrir au sens de l'invention, sous cette dénomination, tout composé ou mélange à caractère lipidique et chargé positivement, déjà proposé à titre d'agent actif à l'égard de la transfection cellulaire d'acides nucléiques.

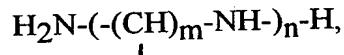
5 De manière générale, il s'agit de molécules amphiphiles comprenant au moins une région lipophile associée ou non à une région hydrophile.

A titre représentatif de la première famille de composés, on peut notamment proposer des mélanges lipidiques susceptibles de former des liposomes cationiques. Ces formulations peuvent ainsi contenir du POPC, phosphatidylserine, 10 phosphatidylcholine, cholestérol, lipofectamine ou du maléimidophénylbutyrylphosphatidyléthanolamine associé à un lipide cationique tel que défini ci-après..

Selon un mode particulier de l'invention, l'agent lipofectant mis en oeuvre possède une région cationique.

15 A titre illustratif de ce type de lipides cationiques construits sur le modèle de structure : groupe lipophile associé à un groupement amino via un bras dit "spacer" on peut plus particulièrement citer le DOTMA et également ceux comprenant à titre de groupement lipophile deux acides gras ou un dérivé du cholestérol, et comportant, en outre, le cas échéant, à titre de groupement amino, un groupement d'ammonium 20 quaternaire. Les DOTAP, DOBT ou le ChOTB peuvent notamment être cités à titre représentatifs de cette catégorie de lipides cationiques. D'autres composés, comme les DOSC et ChOSC, se caractérisent par la présence d'un groupement choline à la place du groupement d'ammonium quaternaire.

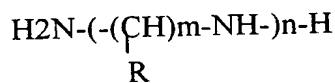
Avantageusement, les lipofectants convenant à l'invention peuvent également être choisis parmi des lipopolyamines dont la région polyamine répond à la formule générale

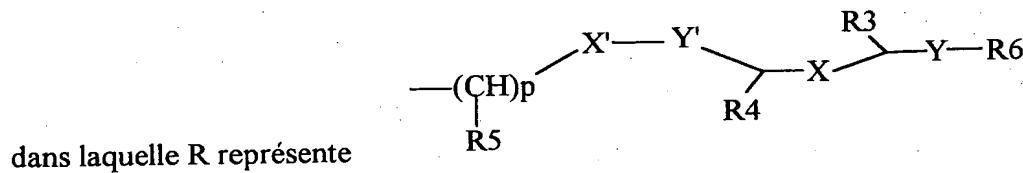


5 dans laquelle m est un nombre entier supérieur ou égal à 2 et n est un nombre entier supérieur ou égal à 1, m pouvant varier entre les différents groupes de carbone compris entre 2 amines, cette région polyamine étant associée de manière covalente à une région lipophile de type chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, du cholestérol, ou un lipide naturel ou synthétique capable de former des phases lamellaires ou 10 hexagonales. Cette région polyamine est plus préférentiellement représentée par la spermine, la thermine ou un de leurs analogues ayant conservé ses propriétés de liaison à l'acide nucléique.

La demande de brevet EP 394 111 décrit des lipopolyamines de cette famille susceptibles d'être mises en oeuvre dans le cadre de la présente invention. A titre 15 représentatif de ces lipopolyamines on peut plus particulièrement citer la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) et la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE).

Les lipopolyamines décrites dans la demande de brevet WO96/17823 peuvent également être utilisées avantageusement selon l'invention. Elles sont représentées par 20 la formule générale

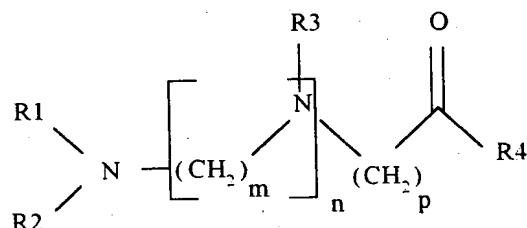




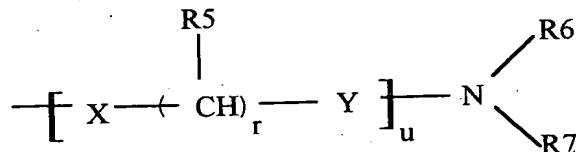
- où -X et X' représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'oxygène, un groupement méthylène $-(\text{CH}_2)_q-$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino -NH- ou -NR'- avec R' représentant un groupement alkyle en C₁ à C₄, - Y et Y' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement C=S, - R₃, R₄ et R₅ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué ou non, en C₁ à C₄, avec p pouvant varier entre 0 et 5, - R₆ représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino -NR₁R₂ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C₁₂ à C₂₂.

A titre représentatif de ces lipopolyamines on peut tout particulièrement citer le (Dioctadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle et le (Dioctadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2 propyle.

- Enfin plus récemment, de nouvelles lipopolyamines, valorisables également dans le cadre de la présente invention, ont été décrites dans la demande de brevet PCT/FR 96/017474. Il s'agit de composés de formule générale comme suit



Dans laquelle - R₁, R₂ et R₃ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement -(CH₂)_q-NRR' avec q pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R₁, R₂ et R₃ et R et R' représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement -(CH₂)_{q'}-NH₂, q' pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R et R', - m, n et p représentent, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier pouvant varier entre 0 et 6 avec lorsque n est supérieur à 1, m pouvant prendre des valeurs différentes et R₃ des significations différentes au sein de la formule générale et -R₄ représente un 10 groupement de formule générale



dans laquelle - R₆ et R₇ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique, saturé ou non, en C₁₀ à C₂₂ avec au moins l'un des deux groupements étant différent de l'hydrogène, u est un nombre entier choisi entre 0 et 10 avec lorsque u est un entier supérieur à 1 R₅, X, Y et r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents motifs [X-(CHR₅)_r-Y], -X représente un atome d'oxygène, de soufre ou un groupement amine monoalkylé ou non, - Y représente un groupement carbonyle ou un groupement méthylène, - R₅ représente un atome d'hydrogène ou une chaîne latérale d'acide aminé naturel, le cas échéant substituée et -r représente un entier variant entre 1 et 10 avec lorsque r est égal à 1, R₅ 15 représentant une chaîne latérale d'acide aminé naturel substitué ou non et lorsque r est supérieur à 1, R₅ représentant un atome d'hydrogène.

A titre représentatif de ces lipopolyamines on peut plus particulièrement mentionner celles qui suivent:

{H₂N(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂}(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂

5 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₈]₂

H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArgN[(CH₂)₁₈]₂

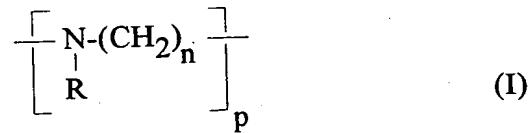
De manière particulièrement avantageuse, on peut utiliser dans le cadre de l'invention la lipofectamine, la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) la 5-carboxyspermylamine de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES), le Dioctadécyld-carbamoylméthoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle, le (Dioctadécyld-carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2 propyle,

10 {H₂N(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂}(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂, le H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₈]₂, le

15 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArgN[(CH₂)₁₈]₂ et/ou le H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇CH₃]₂.

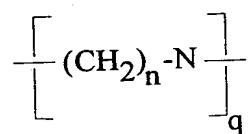
Il peut également s'agir de lipides cationiques incorporant un ou plusieurs groupements guanidinium et/ou amidinium, comme plus particulièrement ceux décrits par J.M. LEHN et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1996, 93, 9682-9686).

20 Selon la présente invention, le polymère cationique susceptible d'être mis en oeuvre à titre d'agent de transfection cationique est de préférence un composé de formule générale I comme suit,



dans laquelle

- R peut être un atome d'hydrogène ou un groupe de formule



5 - n est un nombre entier compris entre 2 et 10;

- p et q sont des nombres entiers,

étant entendu que la somme p+q est telle que le poids moléculaire moyen du polymère soit compris entre 100 et 10^7 Da.

Il est entendu que, dans la formule (I) ci-dessus, la valeur de n peut varier entre
10 les différents motifs p. Ainsi, la formule (I) regroupe à la fois les homopolymères et les hétéropolymères.

Plus préférentiellement, dans la formule (I), n est compris entre 2 et 5. En particulier, les polymères de polyéthylène imine (PEI) et polypropylène imine (PPI) présentent des propriétés tout à fait avantageuses. Les polymères préférés pour la mise en oeuvre de la présente invention sont ceux dont le poids moléculaire est compris entre 10^3 et 5.10^6 . A titre d'exemple, on peut citer le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 50 000 Da (PEI50K), le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 22 000 Da (PEI22K) ou le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 800 000 Da (PEI800K).

Les PEI50K, PEI22K et PEI800K sont accessibles commercialement. Quant aux autres polymères représentés par la formule générale I, ils peuvent être préparés selon le procédé décrit dans la demande de brevet FR 94 08735.

Dans les compositions de la présente invention, l'acide nucléique complexé avec l'agent de transfection cationique peut être aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent être modifiés chimiquement.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin de même que des oligonucléotides courts ou des séquences plus longues. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réPLICATION, des séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc.

Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune

pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

10 Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, 15 HARP/pléiotrophine, etc la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les 20 gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les gènes correspondant aux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, de type apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), les enzymes du métabolisme comme par exemple la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique, la lécithine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, ou encore des protéines de 25 transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholesterol et la

protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs LDL, récepteurs des chylomicrons-remnants et les récepteurs scavenger.etc.

L'acide nucléique thérapeutique peut également être un gène ou une séquence 5 antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences 10 codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, 15 l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncitia forming virus, d'autres virus ou 20 encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences 25 sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de

séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences 5 promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en 10 amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit 15 thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

Dans un autre mode de mise en oeuvre, les compositions revendiquées peuvent comprendre en outre un adjuvant de type dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphos-phatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 20 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyelines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Très récemment, la demanderesse a démontré qu'il était également 25 particulièrement avantageux d'employer à titre d'adjuvant dans des compositions

transfектantes, un composé intervenant, directement ou non, au niveau de la condensation d'acides nucléiques. Ce composé est constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10. Un tel agent peut également dériver d'une partie d'une histone, d'une nucléoline, d'une protamine et/ou de l'un de leurs dérivés. 5 (WO96/25508). Un tel composé peut être avantageusement incorporée dans la composition revendiquée.

Les compositions selon l'invention peuvent également mettre en oeuvre un ou plusieurs éléments de ciblage permettant de diriger les complexes nucléiques vers des 10 récepteurs ou des ligands à la surface de la cellules. A titre d'exemple, la composition de la présente invention peut comprendre un ou plusieurs anticorps dirigés contre des molécules de la surface cellulaire, ou encore un ou plusieurs ligands de récepteurs membranaires comme l'insuline, la transferrine, l'acide folique ou tout autre facteur de croissance, cytokines ou vitamines. Avantageusement, la composition peut utiliser des 15 lectines, modifiées ou non, afin de cibler des polysaccharides particuliers à la surface de la cellule ou sur la matrice extracellulaire avoisinante. Des protéines à motif RGD, des peptides contenant un tandem de motifs RGD, cyclique ou non, ainsi que des peptides polylysine peuvent ainsi être utilisés. Plus récemment, il a également été décrit des peptides ligands, naturels ou synthétiques, intéressants notamment pour leur 20 sélectivité vis à vis de cellules spécifiques et capables de promouvoir efficacement l'internalisation au niveau de ces cellules. (Bary et al. Nature Medicine, 2, 1996, 299- 305). Ces agents de ciblages sont généralement conjugués à l'agent de transfection cationique considéré.

La présente invention vise également un procédé de préparation des 25 compositions revendiquées. Plus précisément, elle se rapporte à un procédé de

préparation d'une composition comprenant des particules de complexes agent(s) de transfection cationique(s)/acides nucléiques, stabilisées en taille, caractérisé en ce que l'agent transfectant et l'acide nucléique sont mis en contact, en présence d'une quantité suffisante en agent de surface non ionique pour stabiliser les particules de complexes nucléiques ainsi formées à une taille inférieure à environ 160nm.

Plus précisément, l'un des composants à savoir l'acide nucléique ou le lipofectant est au préalable mélangé à l'agent de surface non ionique avant d'être mis en présence avec le second composant. On prévient ainsi la manifestation de tout phénomène d'aggrégation qui spontanément se serait manifesté en absence dudit agent de surface non ionique.

Les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus ou les voies circulatoires, soit d'un

traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation in vivo, par injection ou greffe.

Les compositions selon l'invention sont particulièrement avantageuses sur le plan thérapeutique.

5 On peut désormais envisager selon la présente invention d'administrer efficacement des complexes acides nucléiques de taille convenable et de rapport de charge réduits ce qui est particulièrement bénéfique sur le plan in vivo. Les interactions sérum/complexes nucléiques généralement observées sont avec les compositions revendiquées significativement atténuées.

10 La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Liste des figures:

Figure 1: Effet du poloxalkol sur l'évolution de la taille des complexes RPR120535/ADN, au rapport 1,7 molRPR120535/mol bp, en fonction du temps.

15 Figure 2: Effet du poloxalkol sur l'évolution de la taille des complexes RPR120531/ADN, au rapport 1,7 molRPR120531/mol bp en fonction du temps.

Figure 3: Effet du poloxalkol sur les associations RPR120535/ADN

20 Figure 4: Effet du poloxalkol sur l'activité luciférase (rlu/5µl de lysat) des complexes RPR120535/ADN, au rapport 1,7 mol RPR120535/mol bp.

MATERIELS

- L'agent de surface mis en oeuvre dans les exemples ci-après est le poloxalkol de formule:

OH(CH₂CH₂O)₇₅(CH(CH₃)CH₂OH)₃₀(CH₂CH₂O)₇₅H. Il est commercialisé sous la marque Pluronic F68®. La solution mère de poloxalkol mise en oeuvre dans les

5 exemples qui suivent est à 10 % (poids/volume) dans l'eau.

- L'ADN utilisé pour réaliser les échantillons est le plasmide de pXL2774 décrit dans le PCT/FR 96/01414. Il est utilisé à une concentration de 0,7 mg/ml dans un tampon Tris/EDTA (10mM/0,1mM) pH7,5.

10 - Les lipides cationiques utilisés sont:

-H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₈]₂ (RP120535) (sel d'acétate) et

- H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArgN[(CH₂)₁₈] (RP120531) (sel d'acide trifluoroacétique)

15 tous deux décrits dans le PCT/FR 96/01774.

Ils sont utilisés à une concentration de 5 mM dans de l'eau où ils sont solubilisés par chauffage à 50 °C pendant 25 minutes, les solutions étant ensuite refroidies à température ambiante.

20 **METHODES**

- La mesure du diamètre hydrodynamique est réalisée avec un Coulter N4Plus, en utilisant des cuves plastiques (quatre faces transparentes) remplies avec 800 µl des différentes solutions, la mesure étant réalisée à 90 °C en mode unimodale.

25 - Les mesures de fluorescence sont réalisées sur Perkin Elmer LS50B, en utilisant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 260 nm et 590 nm. Les

largeurs de fentes pour l'excitation et l'émission sont réglées à 5 nm. La valeur de fluorescence est enregistrée après ajout de 5 µg de Bromure d'étidium/ml en concentration finale.

5 **EXEMPLE 1**

Influence du poloxalkol sur la taille des complexes RPR120535/ADN.

Le plasmide (10 µg/ml) est mis dans une solution contenant 150 mM NaCl et différentes concentration en poloxalkol. Le lipofectant RPR120535 est ensuite ajouté 10 pour obtenir un rapport 1,7 mol RPR120535/mol bp. La taille des complexes est ensuite mesurée par spectroscopie de corrélation de photons selon le protocole décrit en Méthodes. Les résultats sont présentés en figure 1.

On note qu'en absence de poloxalkol (□), la taille des particules évolue de 274 nm à 15 jusqu'à un maximum de 1000 nm en quelques dizaine de minutes. Puis on observe un précipité après quelques heures d'incubation.

En revanche, en présence de 0,1 % (+) de poloxalkol, on observe une augmentation de la taille des complexes, taille qui demeure stable pour une concentration de 0,8 (○) et 1 % (▲) de poloxalkol et n'évolue pas au delà de 150nm.

20 L'incubation du lipofectant seul avec le poloxalkol à 1% (poids/volume) ne forme pas de particules détectables par Diffusion Quasi Elastique de la lumière. De même lorsque l'ADN est incubé avec le poloxalkol à 1% aucune particule ne peut être détectée.

EXEMPLE 2

Influence de poloxalkol sur la taille des complexes RPR120531 /ADN.

Pour ce faire, l'exemple n°1 a été répété avec le lipide cationique, RPR120531.

Le plasmide (10 µg/ml) est mis dans une solution contenant 150 mM NaCl à différentes concentration en poloxalkol. Le RPR120531 est ensuite ajouté pour obtenir un rapport 1,7 mol RPR120535/mol bp. La taille des complexes est mesurée par spectroscopie de corrélation de photons (Coulter N4plus). Les résultats sont présentés
5 en figure 2.

On note qu'en absence de poloxalkol la taille des complexes RPR 120531/ADN évolue de 234 nm à 590 nm en quelques heures alors qu'elle demeure stable en présence de 0,5% (▲) et 0,9% (○) de poloxalkol.

10 **EXEMPLE 3**

Contrôle du degré de compaction ADN/lipofectant en présence et en absence de poloxalkol.

Il a été vérifié que les particules obtenues en présence de poloxalkol étaient bien des particules issues de l'association de l'ADN avec le lipide cationique. A ces fins, des expériences d'insertion d'une sonde, qui fluoresce lorsqu'elle est intercalée dans l'ADN ont été réalisées. Le niveau de fluorescence est important lorsque l'ADN est libre et en revanche faible lorsque celui-ci est inaccessible car compacté au lipide cationique. La figure 3 rend compte des résultats obtenus.
15

20 On observe les niveaux de fluorescence obtenus après association de l'ADN au lipide cationique en présence et en absence de poloxalkol. Tout d'abord on note que la fluorescence du bromure d'éthidium intercalé à l'ADN n'est pas modifié par la présence ou l'absence de 1% de poloxalkol. Les niveaux de fluorescence des complexes lipide cationique/ADN (1,7 mol RPR120535/mol pb ADN) en présence ou
25 en absence de 1% poloxalkol sont en effet du même ordre. Cette valeur de fluorescence résiduelle indique que l'ADN n'est pas accessible pour la sonde.

En conclusion , le poloxalkol n'empêche donc pas l'association de l'ADN avec le
30 lipide cationique de se faire normalement.

EXEMPLE 4

Transfection in vitro avec de l'ADN ou du RPR120535 contenant 1 % de poloxalkol.

5 Nous avons voulu vérifier quel était l'effet du poloxalkol lorsqu'il était mélangé à de l'ADN seul ou à du lipide cationique seul. Pour cela les deux échantillons suivants ont été préparés:

Préparation des échantillons

- 10 Echantillon 1: 10 µg ADN/ml dans un milieu contenant 300 mM NaCl et 1 % (poids/volume) de poloxalkol.
 Echantillon 2: 60 µM de RPR120535 dans un milieu contenant 300 mM NaCl et 1% poloxalkol.

15 Ces échantillons sont préparés en mélangeant dans l'ordre pour l'échantillon 1: eau, NaCl, ADN, poloxalkol et pour l'échantillon 2, eau, NaCl, poloxalkol et RPR120535 dans les quantités figurant dans le tableau I ci-dessous.

Essai	H ₂ O µl	NaCl (5M) µl	ADN (0,7 mg/ml) µl	poloxalkol (10%) µl	RPR120535 (5 mM) µl
1	413	30	7,1	50	0
2	414	30	0	50	6

TABLEAU I

- 20 L'activité biologique de ces deux échantillons est testée sur des cellules NIH 3T3. Un volume de 50 µl des différents échantillons est déposé par puits sur plaque de 24 puits. La transfection est réalisée en absence de sérum de veau foetal. Ce dernier est ajouté 2 heures après l'addition des complexes.
 Les résultats indiquent qu'aucun transfert de gène n'est observé avec l'ADN en présence de 1 % de poloxalkol, en absence de 10 % de sérum de veau foetal.

D'autre part le dosage des protéines totales démontre qu'il n'y a pas de toxicité apparente.

EXEMPLE 5

- 5 **Transfection in vitro avec des solutions de complexes lipofectant RPR120535/ADN stabilisées à différentes concentrations en poloxalkol.**

On a cherché à apprécier l'incidence de la stabilisation des particules par le poloxalkol sur l'efficacité de transfection de ces particules en présence de poloxalkol.

- 10 Pour se faire, des échantillons contenant différentes concentrations en poloxalkol ont été préparés.

Quatre échantillons de rapport 1,7 moles RPR120535/mol pb d'ADN sont préparés dans un milieu contenant 300 mM NaCl à différentes concentrations en poloxalkol (0; 0,5 %; 0,8 % et 1%; poids/volume):

- 15 Echantillon 1: 1,7 moles RPR120535/mol pb d'ADN; 300 mM NaCl
 Echantillon 2: 1,7 moles RPR120535/mol pb d'ADN; 300 mM NaCl, 0,5 % poloxalkol
 Echantillon 3: 1,7 moles RPR120535/mol pb d'ADN; 300 mM NaCl, 0,8 % poloxalkol
 20 Echantillon 4: 1,7 moles RPR120535/mol pb d'ADN; 300 mM NaCl, 1 % poloxalkol

Ces échantillons ont été préparés en mélangeant dans l'ordre: eau, NaCl, ADN, poloxalkol et RPR120535 dans les quantités figurant en tableau II ci-dessous.

Essai	H ₂ O μl	NaCl (5M) μl	ADN (0,7 mg/ml) μl	poloxalkol (10%) μl	RPR120535 (5 mM) μl
1	737	48	11,4	0	4
2	697	48	11,4	40	4

3	672	48	11,4	64	4
4	657	48	11,4	80	4

TABLEAU II

- * L'échantillon 1 appartient à une gamme de concentration en lipide cationique où il n'y a pas de stabilité des particules en solution, c'est-à-dire que les particules s'agrègent les unes aux autres pour former de larges paquets d'agrégats qui possèdent des diamètres hydrodynamique important (supérieur à 1000 nm).
 - * L'échantillon 2 a le même rapport lipide cationique/ADN que l'échantillon 1, mais le mélange est réalisé en présence de 0,5 % (poids)/volume de poloxalkol. Cependant cette concentration n'est pas suffisante pour assurer une stabilisation complète des particules (cf exemple N° 1 Influence d'un polymère non-ionique sur la taille des complexes RPR120535/ADN).
 - * Les échantillons 3 et 4 sont stables, le diamètre hydrodynamique des particules restent aux alentours de 150 nm.
- L'activité biologique des différentes formulations est testée sur des cellules NIH 3T3.
- Un volume de 50 µl des différents échantillons (à 10 µg ADN/ml) est ajouté par puits.
- La transfection est réalisée en absence de sérum de veau foetal. Ce dernier est ajouté 2 heures après l'addition des complexes. Les résultats obtenus sont présentés en figure 4.
- On note en figure 4 que le poloxalkol, quelque soit sa concentration, n'altère pas la transfection *in vitro* des cellules NIH 3T3. Le poloxalkol ne modifie pas les propriétés de transfection en absence de sérum de veau foetal des complexes RPR120535/ADN au rapport 1,7 mol RPR120535/mol bp ADN.

REVENDICATIONS

1. Composition utile en thérapie génique comprenant des particules de complexes agent(s) de transfection cationique(s)/acides nucléiques stabilisées caractérisée en ce qu'elle incorpore en outre au moins un agent de surface non ionique en quantité suffisante pour stabiliser la taille desdites particules à une dimension inférieure ou égale à 160nm.
5
2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'agent de transfection cationique et l'acide nucléique y sont présents dans un rapport de charge compris entre 1 et 6.
10
3. Composition selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que l'agent de transfection cationique et l'acide nucléique y sont présents dans un rapport de charge inférieur à 4.
4. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de surface comprend au moins un segment hydrophobe et au moins un segment hydrophile.
15
5. Composition selon la revendication 4 caractérisée en ce que le segment hydrophobe est choisi parmi les chaînes aliphatiques, les polyoxyalkylènes, les polyesters d'alkyldène et le cholestérol.
20
6. Composition selon la revendication 4 ou 5 caractérisée en ce que le segment hydrophile est choisi parmi les polyoxyalkylènes et les mono- ou di-saccharides.
25
7. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de surface est un poloxalkylène de formule générale
$$\text{HO(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_a(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH})_b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_c\text{H}$$

avec a, b et c représentant indépendamment l'un de l'autre des nombres entiers pouvant varier entre 20 et 100.

8. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que 5 elle contient à titre d'agent de surface un composé de formule générale $\text{OH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^a(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH})^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^c\text{H}$, avec a égal à 75, b à 30 et c à 75.

9. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de surface y est présent à une concentration comprise entre 1% à 10% 10 poids/volume de ladite composition.

10. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de surface y est présent à une concentration comprise entre 1 et 5% poids/volume de ladite composition.

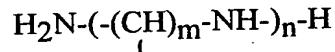
11. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'agent de transfection cationique est un lipofectant. 15

12. Composition selon la revendication 11 caractérisée en ce que le lipofectant est une molécule amphiphile comprenant au moins une région lipophile associée ou non à une région hydrophile.

13. Composition selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un 20 mélange lipidique susceptible de former des liposomes cationiques.

14. Composition selon la revendication 11 ou 12 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un lipide cationique.

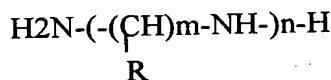
15. Composition selon la revendication 11 ou 12 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un lipofectant comprenant au moins une région polyamine de formule générale



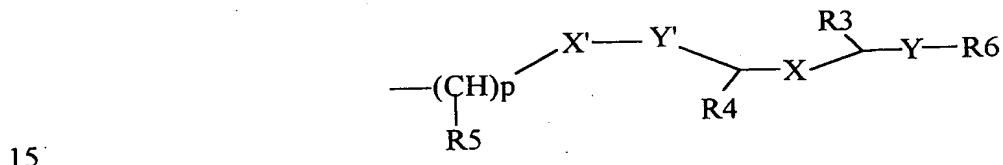
dans laquelle m est un nombre entier supérieur ou égal à 2 et n est un nombre entier supérieur ou égal à 1, m pouvant varier entre les différents groupes de carbone compris entre 2 amines, associée de manière covalente à une région lipophile de type chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, du cholestérol, ou un lipide naturel ou synthétique capable de former des phases lamellaires ou hexagonales.

16. Composition selon la revendication 15 caractérisée en ce que la région polyamine est représentée par la spermine, la thermine ou un de leurs analogues ayant conservé ses propriétés de liaison à l'acide nucléique.

10 17. Composition selon la revendication 11 ou 12 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un lipofectant de formule générale



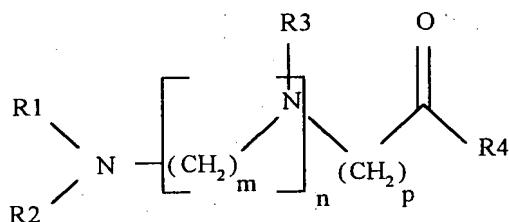
dans laquelle R figurant la région lipophile est représenté par la formule générale



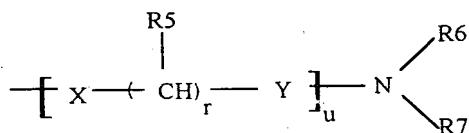
dans laquelle - X et X' représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'oxygène, un groupement méthylène $-(\text{CH}_2)_q-$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino, -NH- ou -NR'- avec R' représentant un groupement alkyle en C₁ à C₄, - Y et Y' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement C=S, - R₃, R₄ et R₅ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué

ou non, en C₁ à C₄, avec p pouvant varier entre 0 et 5, - R₆ représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino -NR₁R₂ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C₁₂ à C₂₂.

- 5 18. Composition selon la revendication 11 ou 12 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un lipofectant de formule générale



- Dans laquelle R1, R2 et R3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement -(CH₂)_q-NRR' avec q pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 10 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R1, R2 et R3 et R et R' représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement -(CH₂)_{q'}-NH₂, q' pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R et R', m, n et p représentent, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier pouvant varier entre 0 et 6 avec lorsque n est supérieur à 1, m pouvant prendre des valeurs différentes et R3 des 15 significations différentes au sein de la formule générale III et R4 représente un groupement de formule générale



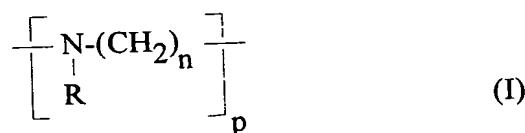
- dans laquelle R6 et R7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome 20 d'hydrogène ou un radical aliphatique, saturé ou non, en C₁₀ à C₂₂ avec au moins l'un

des deux groupements étant différent de l'hydrogène, u est un nombre entier choisi entre 0 et 10 avec lorsque u est un entier supérieur à 1 R5, X, Y et r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents motifs [X-(CHR5)r-Y], X représente un atome d'oxygène, de soufre ou un groupement amine monoalkylé ou non, Y représente un groupement carbonyle ou un groupement méthylène, R5 représente un atome d'hydrogène ou une chaîne latérale d'acide aminé naturel , le cas échéant substituée et r représente un entier variant entre 1 et 10 avec lorsque r est égal à 1, R5 représentant une chaîne latérale d'acide aminé naturel substitué ou non et lorsque r est supérieur à 1, R5 représentant un atome d'hydrogène.

10 19. Composition selon l'une des revendications 11 ou 12 caractérisé en ce qu'il
s'agit d'un lipide cationique porteur d'un ou plusieurs groupements guanidinium et/ou
amidinium.

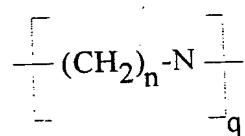
20. Composition selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisée en ce que l'agent de transfection cationique est un polymère cationique.

15 21. Composition sleon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un
composé de formule générale I,



dans laquelle

- R peut être un atome d'hydrogène ou un groupe de formule



- n est un nombre entier compris entre 2 et 10;

- p et q sont des nombres entiers,

étant entendu que la somme p+q est telle que le poids moléculaire moyen du polymère soit compris entre 100 et 10^7 Da.

5 22. Composition selon la revendication 20 ou 21 caractérisée en ce qu'il s'agit du polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 50 000 Da (PEI50K), du polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 22 000 Da (PEI22K), ou le polyéthylène imine de poids moléculaire moyen 800 000 Da (PEI800K).

10 23. Composition selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisée en ce que l'agent de transfection cationique est de préférence choisi parmi la lipofectamine, la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) la 5-carboxyspermylamine de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES), le (Dioctadécyld-carbamoylméthoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle ou le (Dioctadécyld-carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2 propyle, le
15 $\{H_2N(CH_2)_3\}_2N(CH_2)4N\{(CH_2)_3NH_2\}(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2$, le $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{18}]_2$, le $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)4NH(CH_2)_3NHCH_2COArgN[(CH_2)_{18}]_2$ et le $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$.

20 24. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.

25. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.

26. Composition selon la revendication 24 ou 25 caractérisée en ce que l'acide nucléique est modifié chimiquement.

27. Composition selon l'une des revendications 1 à 23 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un antisens.

5 28. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.

29. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un adjuvant de type dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphos-phatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -
10 palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides.

15 30. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle associe en outre à l'agent de transfection cationique un élément de ciblage.

31. Composition selon la revendication 30 caractérisée en ce que cet élément de ciblage est choisi parmi les anticorps dirigés contre des molécules de la surface cellulaire, des ligands de récepteurs membranaires comme l'insuline, la transferrine, l'acide folique ou tout autre facteur de croissance, cytokines ou
20 vitamines, des lectines, modifiées ou non, des protéines à motif RGD, des peptides contenant un tandem de motifs RGD, cyclique ou non, des peptides polylysine ainsi que des peptides ligands naturels ou synthétiques.

ORIGINALE

32. Procédé de préparation d'une composition comprenant des particules de complexes agent(s) de transfection cationique(s)/acides nucléiques caractérisé en ce que l'agent transfectant et l'acide nucléique sont mis en contact, en présence d'une quantité suffisante d'un agent de surface non ionique pour stabiliser les particules de complexes nucléiques ainsi formées à une taille inférieure à environ 160nm.

5 33. Procédé selon la revendication 32 caractérisé en ce que l'un des composants choisi parmi l'acide nucléique ou le lipofectant est au préalable mélangé à l'agent de surface non ionique avant d'être mis en présence avec le second composant.

10 34. Procédé selon la revendication 32 ou 33 caractérisé en ce que l'agent de surface y est défini selon les revendications 4 à 10.

ORIGINAL

1/4

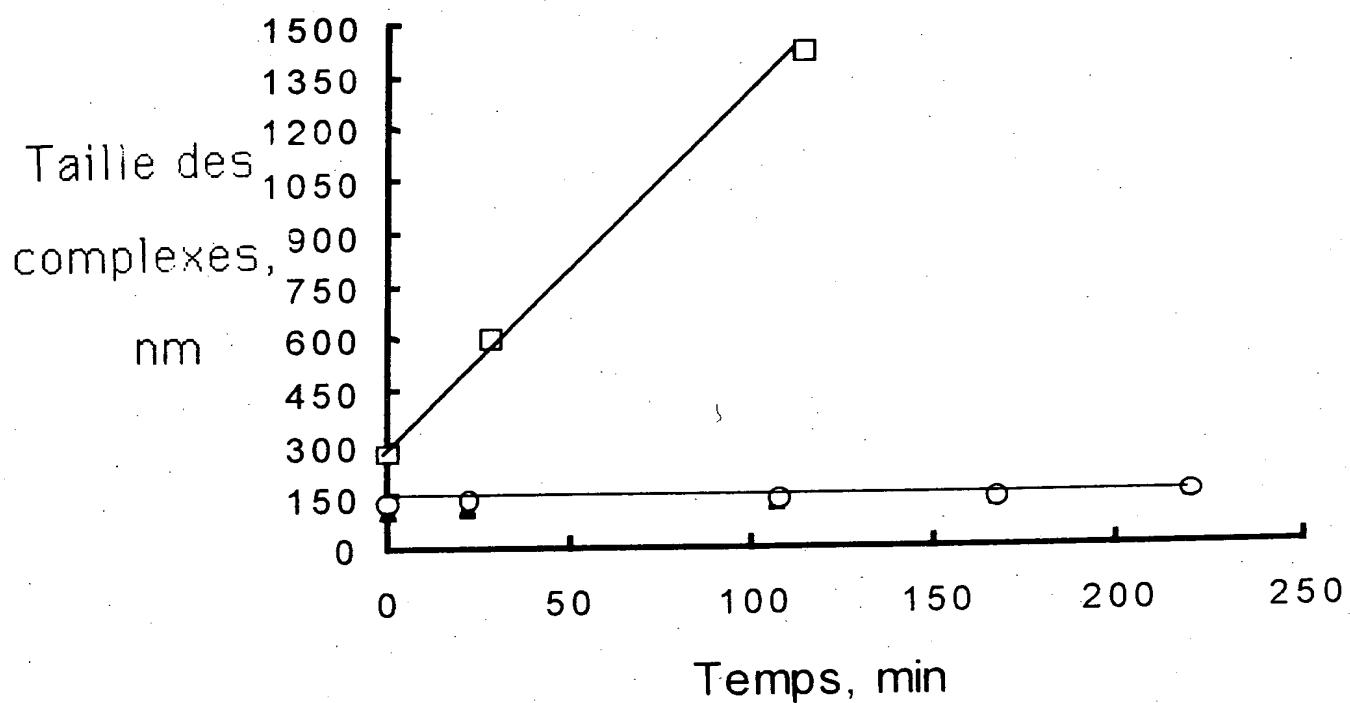


Figure 1

ORIGINAL

2/4

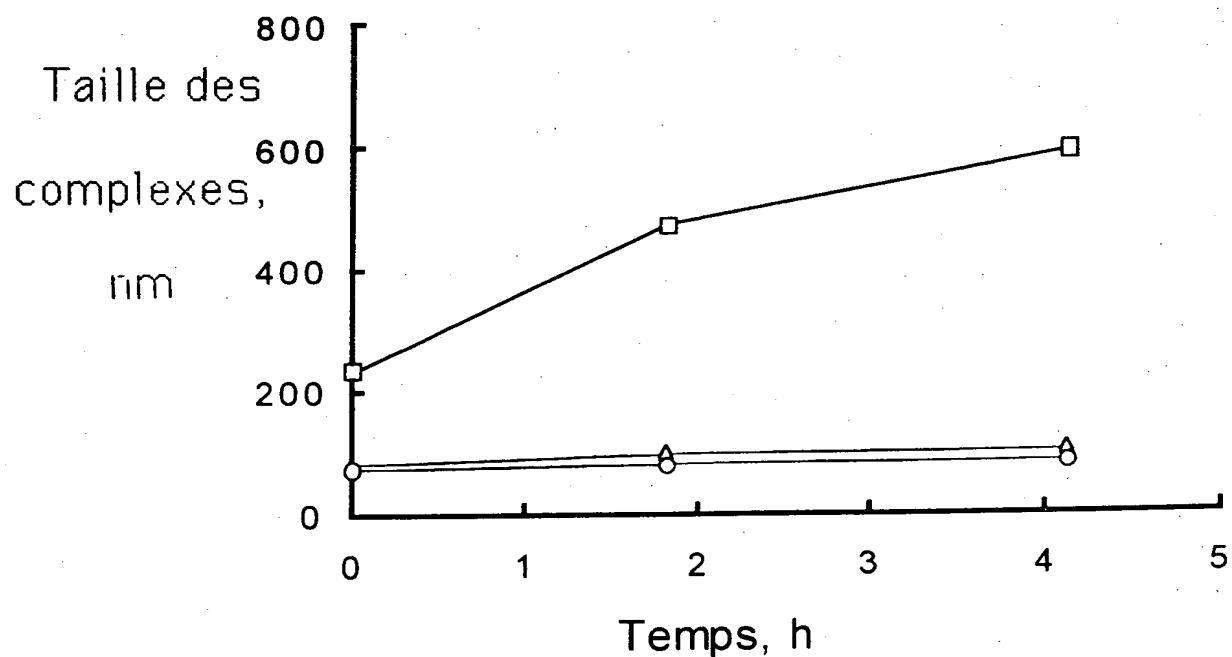


Figure 2

ORIGINAL

3/4

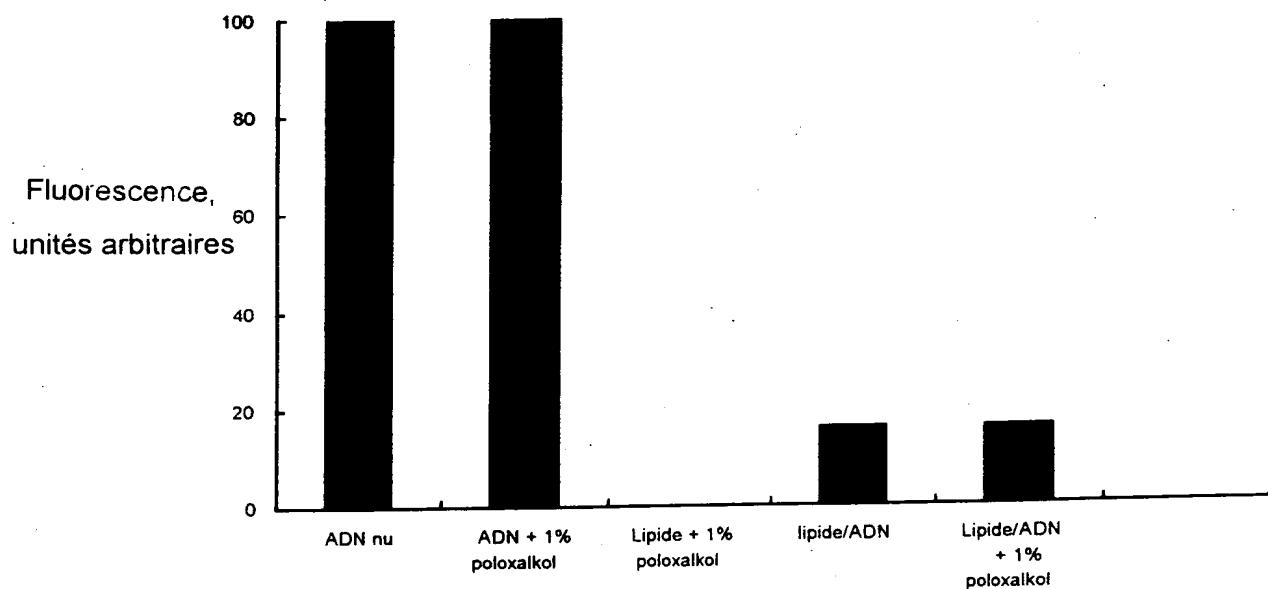


Figure 3

ORIGINAL

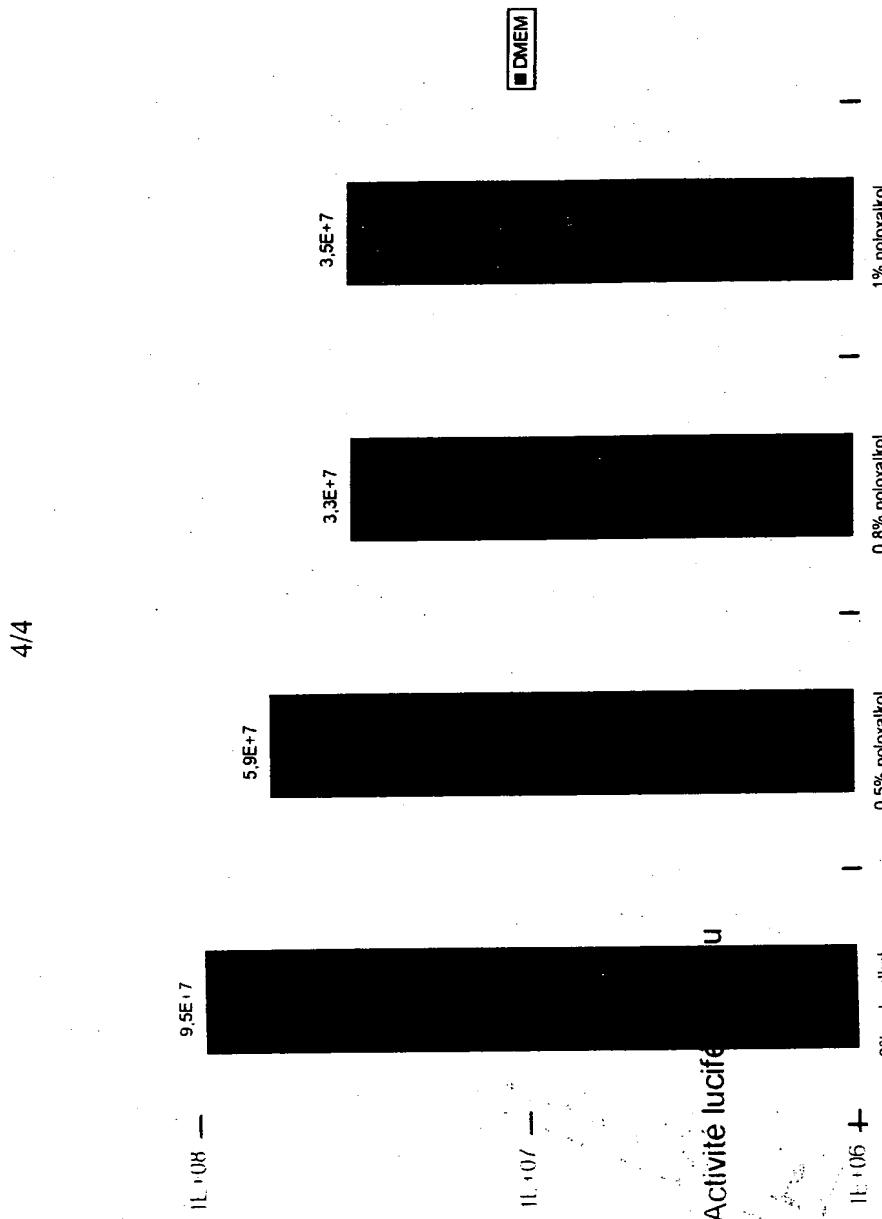


Figure 4